

(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, A01K 67/00, C12Q 1/68		A1	(11) 国際公開番号 WO97/41217
			(43) 国際公開日 1997年11月6日(06.11.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01470		(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)	
(22) 国際出願日 1997年4月24日(24.04.97)		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) 優先権データ 特願平8/134422 1996年4月30日(30.04.96) JP		(添付公開書類 国際調査報告書)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 飯田 満(IIDA, Mitsuru)(JP/JP) 〒772 徳島県鳴門市撫養町立岩字元地232-1 Tokushima, (JP)			
小平 司(KODAIRA, Tsukasa)(JP/JP) 〒771-02 徳島県板野郡松茂町広島字南川向56-7 Tokushima, (JP)			
村上 尚(MURAKAMI, Takashi)(JP/JP) 〒770 徳島県徳島市佐古一番町9-6 アルフェリア佐古一一番町902 Tokushima, (JP)			
島 健二(SHIIMA, Kenji)(JP/JP) 〒770 徳島県徳島市中吉野町二丁目22-3 Tokushima, (JP)			

(54) Title: ob PROTEIN RECEPTOR GENES AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称 ob 蛋白レセプター遺伝子及びその用途

(57) Abstract

ob Protein receptor genes expressing the expression character of obesity which are applicable to the gene diagnosis of spontaneous model animals with obesity, etc. ob Protein receptor genes originating in warm-blooded animals expressing the expression character of obesity; an ob protein receptor gene encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 wherein the codon at the 269-position is a base sequence encoding proline; and an ob protein receptor gene having the base sequence represented by SEQ ID NO: 2 wherein the nucleotide at the base no. 806 is cytosine.

本発明は、肥満の表現形質を発現する α β 蛋白レセプター遺伝子を提供し、肥満を自然発症するモデル動物の遺伝子診断等への応用を開示するものである。つまり本発明は、肥満の表現形質を発現する温血動物由来の α β 蛋白レセプター遺伝子、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする α β 蛋白レセプター遺伝子において、コドン 269 位がプロリンをコードする塩基配列であることを特徴とする α β 蛋白レセプター遺伝子、および配列番号 2 で示される塩基配列を有する α β 蛋白レセプター遺伝子において、塩基番号 806 位のヌクレオチドがシトシンであることを特徴とする α β 蛋白レセプター遺伝子である。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シェラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルガリア・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BK	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	イスス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴィエトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CZ	チエコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

明 細 書

o b 蛋白レセプター遺伝子及びその用途

技 術 分 野

5 本発明は o b 蛋白レセプターの遺伝子及びその変異体、詳細には、肥満の表現形質を発現する温血動物に由来する o b 蛋白レセプターの遺伝子に関する。

更に本発明は、これらの o b 蛋白レセプター遺伝子の各種分野における応用に関する。

10

背 景 技 術

実験医学の分野では、長い間実験的発症モデル (induced animal model) が疾患モデル動物として利用され、その結果、感染症の疾患や栄養障害による疾患等といった 15 多くの疾患が克服され、人類が健康で文化的な生活を営むことを可能とし、平均寿命を飛躍的に増加させる等、重要な役割を果たしてきた。

しかし、近年に至って、病因がまだ解明されない疾患として、ヒトの体質に内在する因子、言い換えれば遺伝 20 性の素因によって引き起こされる疾病がクローズアップされてきており、これらの疾患の病因を解明し、治療法を確立するための研究に使用できる疾患モデル動物（自

然発症モデル：spontaneous animal model)が必要になってきた。すなわち、モデル動物として、ヒトの疾患に酷似した症状を自然発症する突然変異動物や異常形質を発現する系統動物が必要となってきた。

5 ところで、肥満症は、産業の発達した現代社会において万人に共通した健康上の問題であり、またそれは糖尿病、高血圧、高脂血症等といった重篤な疾患とも関連しているため、永年その病因の解明が望まれている疾患の一つである。

10 この病因に関しては、1994年にY. Zhangらによってマウスから、高インシュリン、高血糖症（II型糖尿病）を発現するobese遺伝子（以下、ob遺伝子という。）が単離・同定され、その遺伝子の劣性突然変異によって、重篤な遺伝性肥満症が引き起こされることが示された〔Nature 15 372, 425-432 (1994)〕。

その後の多くの研究により、大腸菌(E. coli)から精製されたob遺伝子の生成物（以下ob蛋白ともいう。leptin: レプチン）をマウスに投与することにより、マウスの体重が減少することが示されている〔Science 269, 20 540-543 (1995) ; Science 269, 543-546 (1995) ; Science 269, 546-549 (1995) ; Nature 377, 530-532 (1995)〕。

また、良く特徴づけられているマウスの劣性肥満の変異形質 (recessive obesity mutation) は、糖尿病 (diabetes; db) である。db 変異がホモ [同型接合体 (db/db)] であるマウスは、同様に ob 変異がホモである (ob/ob) マウスの表現型 (phenotype) とほとんど同じ肥満表現型を示す。 (ob/ob) マウスと (db/db) マウスについての研究から、 (db/db) マウスは ob 蛋白シグナルの受容機能を欠損している可能性が示されている (Diabetologia 14, 141-148 (1978))。

10 1995年後半、マウス ob 蛋白レセプターの cDNA が、マウス脈絡膜叢由来の cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングされ、その生成物たるレセプターは一回膜を貫通する膜貫通型レセプターであることが示唆された。それは、 gp130、インターロイキン6 レセプターのシグナル変換成分、グラニュロサイトコロニー刺激因子のレセプター及び白血病阻害因子のレセプターと極めて深く関連するものである。マウス ob 蛋白レセプターの細胞内ドメインは、上記レセプター及びアミノ酸 304 個からなるヒトの相同物と比べて短く、たったの 34 アミノ酸からなるものであるが、遺伝子マッピングにより、マウス ob 蛋白レセプター遺伝子がこれらと近接な関係にあることが示されてい

る。

また最近、マウス o b 蛋白レセプター遺伝子にいくつかのスプライス変異体が存在することが報告されており、(db/db)マウスの遺伝子に異常な形にスプライスされた変異体が見つかっている [Cell 84, 491-495, (1996); Nature 379, 632-635 (1996)]。

一方、ラットについては、マウスに比較してその遺伝学はあまり発展しておらず、従来、系統についての関心も薄かった。ところが、上述するように、近年遺伝性の素因によって惹起される病気がヒトの医療における重要な問題となってくるとともに、ラットについても疾患モデルとなりうる遺伝的特性を有するものが、強く求められるようになってきた。それと共に、かかる自然発症モデルラットの迅速な選別および該動物の安定した供給が重要な課題となっている。

発明の開示

本発明者らは、銳意研究を重ねた結果、SDラット並びに肥満表現型 (fatty) のホモ体であるZucker(fa/fa)ラットから、o b 蛋白レセプターのcDNAをクローニングすることに成功した。そして、それらの配列を解析しきつ比較検討することにより、それら特定領域がラッ

ト、ヒト及びマウス間で良く保存されていること、及び S D ラット由来の c D N A と Zucker(fa/fa)ラット由来の c D N A との間に、ヌクレオチドの相違があることを発見し、更に、この相違が肥満表現型に関連していることを見いだして、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とする。 b 蛋白レセプター遺伝子、また、配列番号 2 で示される塩基配列を有することを特徴とする。 b 蛋白レセプター遺伝子である（以下、この遺伝子を第一番目の b 蛋白レセプター遺伝子ともいう。）。

さらに本発明は、肥満の表現形質を発現する温血動物由来の b 蛋白レセプター遺伝子である。具体的には、上記第一番目の b 蛋白レセプター遺伝子において、コ 15 ドン 2 6 9 位がグルタミンの代わりにプロリンをコードする塩基配列であることを特徴とする。 b 蛋白レセプター遺伝子、また、上記第一番目の b 蛋白レセプター遺伝子において、塩基番号 8 0 6 位のヌクレオチドがアデニンの代わりにシトシンであることを特徴とする。 b 蛋 20 白レセプター遺伝子である（以下、この遺伝子を第二番目の b 蛋白レセプター遺伝子ともいう。）。

以下、本明細書において用いるアミノ酸、ペプチド、

塩基配列、核酸などの略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」（日本特許庁編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

5 まず、本発明の第一番目のοb蛋白レセプター遺伝子について説明する。

本発明の遺伝子は、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするラット由来のοb蛋白レセプター遺伝子である。

10 本発明の遺伝子の塩基配列は、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードするものであれば、特に制限されず、コドンの縮重性に基づいて、該アミノ酸配列の各アミノ酸残基をコードし得る任意のコドンを組み合わた塩基配列を有することもできる。好ましくは、配列番号1
15 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列であって、且つその配列中に制限酵素HpaIIまたはMspIの認識部位を有しない塩基配列である。より好ましくは、配列番号2で示される塩基配列である。

尚、本発明のοb蛋白レセプター遺伝子は、少なくとも前述するような塩基配列を構成要素として有するものであればよく、従って、例えば該塩基配列の5'末端又は/及び3'末端側に1乃至は複数の任意の塩基配列を

有していても良い。

当該遺伝子は、ラット、好ましくは肥満の形質を発現しないラットに由来する o_b 蛋白レセプターの遺伝子である。肥満の形質を発現しないものであれば、ラットの系統は特に制限されないが、好ましくは、SD (Sprangue-Dawley) ラット、Wistar ラット等が挙げられる。

本発明の遺伝子は、SD ラットの肺由来の全 RNA を用い、またプライマーとしてマウス o_b 蛋白レセプターの cDNA の翻訳もしくは非翻訳領域に対して特異的であるセンスプライマー〔センスプライマー S1 : G C A A A T C C A G G T G T A C A C C T C T G A A G A A A G (マウス o_b 蛋白レセプターの cDNA の塩基番号 - 30 ~ - 1 の残基)、センスプライマー S2 : G C A T T G T G A G T G A C C C G A G T T A G C A A A G T 15 T A (マウス o_b 蛋白レセプターの cDNA の塩基番号 1139 ~ 1168 の残基)〕及びアンチプライマー〔アンチセンスプライマー A3 : C T G C T C A T T G C A G C A G T A C A C T G C G T C A T A (マウス o_b 蛋白レセプターの cDNA の塩基番号 1242 から 1 20 213 残基)、アンチセンスプライマー A4 : T T G G G T T C A T C T G T A G T G G T C A T G A G A G A C (マウス o_b 蛋白レセプターの cDNA の塩基番号 2

716から2687残基)] [Cell 83, 1263-1271 (1995)] を使用して、逆転写ポリメラーゼ鎖反応 (R T - P C R : reverse transcription-polymerase chain reaction) [Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85, 5698-5702 (1988); Science 241, 708-712 (1988); Science 241, 1823-1825 (1988)] により得られたものである (実施例 1 参照)。

ただし、ラットは上述のように S D ラットに限定されず、また組織も肺に限定されず、種々の組織、器官 (心 10 臓、肺、脾臓、腎臓、睪丸、筋肉、脂肪組織、胰臓、小腸、肝臓等) に由来する RNA を用いることができる。また、P C R に用いるプライマーとしては、マウス o b 蛋白レセプターの c D N A に由来するものである必要はなく、本発明で明らかにされた本発明の遺伝子の配列情報 15 報に基づいて適宜設定することができ、またそれらは常法に従い合成することができる。

次に、本発明の第二番目の o b 蛋白レセプター遺伝子について説明する。

本発明の遺伝子は、肥満の表現形質を発現する温血動物由来の o b 蛋白レセプター遺伝子であり、具体的には配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子において、その塩基配列の一部が、肥

満の表現形質を発現するように変異してなる。○b蛋白レセプター遺伝子等が例示される。

ここで、変異とは、肥満の表現形質を発現するような変異であれば特に限定されず、前述する塩基配列の一部が他の1ないしは複数個のヌクレオチド又は塩基配列で置換されてなる様、上記塩基配列の一部に他の1ないしは複数個のヌクレオチド又は塩基配列が付加されてなる様、及び上記塩基配列の任意の場所の1乃至は複数個のヌクレオチド又は塩基配列が削除されてなる様の10 いずれをも含む概念である。

好みしい変異は、○b蛋白レセプター遺伝子の発現能力は損なわれないが、発現、生成される○b蛋白レセプターの○b蛋白に対する受容機能が低下もしくは損なわれ、肥満形質を誘発するような変異である。より好みくは、変異によって制限酵素認識部位の新たな形成、もしくは消失を伴う変異の様である。

かかる変異様を有する遺伝子であれば、形成及び／又は消失した部位を認識する制限酵素を利用することにより、簡便に変異遺伝子を検出することができる。また、かかる遺伝子の検出は、ひいては遺伝子変異により肥満形質を発現する温血動物を正常な温血動物と区別、選別することに応用できる。

なお、本発明で温血動物とは、哺乳類（ヒト、ラット、ウシ、豚、羊など）及び鳥類等を広く含むものである。

変異のうち、好適には、上記第一番目の α b蛋白レセプター遺伝子が有する塩基配列中の一部が、肥満形質を5発現するように他のヌクレオチドで置換してなる態様のものが挙げられる。

具体的には、第一番目の α b蛋白レセプター遺伝子において、コドン269位がグルタミンの代わりにプロリントをコードする塩基配列となるように置換されてなること10を特徴とする α b蛋白レセプター遺伝子が例示される。より具体的には、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とする α b蛋白レセプター遺伝子が挙げられる。かかる遺伝子の塩基配列は、配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする15ものであれば、特に制限されず、コドンの縮重性に基づいて、該アミノ酸配列の各アミノ酸残基をコードし得る任意のコドンを組み合わた塩基配列を有することもできる。好ましくは、配列番号3記載のアミノ酸配列をコードし、塩基番号806位領域部分に制限酵素HpaIIまたはMspIの認識部位を有しているものである。より好ましくは、第一番目の α b蛋白レセプター遺伝子において、塩基番号806位のヌクレオチドがアデニンの代

わりにシトシンであることを特徴とする o_b 蛋白レセプター遺伝子であり、具体的には、配列番号 4 で示される塩基配列を有することを特徴とするものである。

尚、当該第二番目の o_b 蛋白レセプター遺伝子も、前記第一番目の o_b 蛋白レセプター遺伝子と同様、上で述べる特定の塩基配列を有する限り、その 5' 末端又は／及び 3' 末端側に 1 乃至複数の任意の塩基配列を有しても良い。

当該遺伝子は、肥満形質を発現する温血動物、具体的には遺伝子型として fa/fa (fatty 遺伝形質のホモ体、同型接合体) を有する温血動物の o_b 蛋白レセプターの遺伝子である。かかる遺伝子型を有するものであれば、動物の系統は特に制限されない。

本発明の遺伝子は、具体的には、Zucker (fa/fa) ラット (Zucker, L. M., and Zucker, T. F. (1961) J. Hered. 52, 275-278) の肺由来の全 RNA を用い、またプライマーとして、前述したマウス o_b 蛋白レセプター cDNA の翻訳もしくは非翻訳領域に対して相同性を有するセンスプライマー及びアンチプライマー (Cell 83, 1263-1271 (1995)) を使用して、逆転写ポリメラーゼ鎖反応 (RT - PCR) により得られたものである。

ただし (fa/fa) ラットは上述のように Zucker (fa/fa) ラ

ットに限定されず、また組織も肺に限定されず、種々の組織、器官（心臓、肺、脾臓、腎臓、睪丸、筋肉、脂肪組織、胰臓、小腸、肝臓等）に由来するRNAを用いることができる。

5 また、PCRに用いるプライマーとしては、マウス。
b蛋白レセプターのcDNAに由来するものである必要
はなく、本発明で明らかにされた本発明の遺伝子の配列
情報に基づいて適宜設定することができ、またこれらは
常法に従い合成することができる。

10 本発明の第二番目の。b蛋白レセプター遺伝子の塩基
配列は、前述する第一番目の遺伝子と比較して、その塩
基番号806位がアデニンではなくシトシンである点が
相違している（表現型連関ヌクレオチド変化、図4、図
5参照）。この部位のヌクレオチドの置換（変異）に基
15 づいて、(fa/fa)動物由来の。b蛋白レセプター遺伝子
の塩基配列中には新たに制限酵素HpaIIまたはMsp
I認識部位が形成されている。また、このヌクレオチド
変化により、該ヌクレオチドが形成するコドン269は、
正常型（例えばSDラット）がグルタミン(CAG)で
20 あるのに対し、(fa/fa)型（例えば(fa/fa)ラット）ではプロリン(CCG)になっている。

このように、本発明の第二番目の。b蛋白レセプター

遺伝子は、肥満形質（肥満表現型：obese phenotype）を発現する (fa/fa) 動物が有する特有の o_b 蛋白レセプター遺伝子である。従って、正常な動物の o_b 蛋白レセプター遺伝子との塩基番号 806 位における相違に基づく、
 5 o_b 蛋白レセプターのアミノ酸配列の相違 ($\text{Gln}^{289} \rightarrow \text{Pro}^{289}$) が、該レセプターへの o_b 蛋白（レプチン）の結合機能を何らかの形で破壊することによって、動物の肥満表現型の発現に関連しているものと考えられる。

前述する本発明の第一番目及び第二番目の o_b 蛋白レセプター遺伝子は、本発明により開示された配列情報に基づいて、化学合成、遺伝子工学的手法等の常法を用いて容易に製造することができる [Molecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I, II, III」、日本
 10 生化学会編 (1986) 等参照]。

例えば、本発明の第一番目の o_b 蛋白レセプター遺伝子については、前述の方法の他、ラット等の cDNA ライブラリーから、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて、所望のクローンを選択することにより
 15 調製することができる (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 6613 (1981))。

プローブとしては、本発明で開示する o_b 蛋白レセプ

ター遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定することができ、これらは常法に従い合成することができるが、好適には、後述の実施例3(1)で示されるような [α - 32 P] c C T Pでラベル化されたラット o b 蛋白レセプター c DNA プローブが例示される。 c DNA ライブライマーは、簡便には市販されているものを使用することができる。

また本発明の第二番目の o b 蛋白レセプター遺伝子については、前述のように、遺伝子型として fa/fa、即ち肥満形質の表現型がホモ（同型接合体）である温血動物、具体的には Zucker(fa/fa)ラット、 Wistar(fa/fa)ラット等の全 RNA から、適当なプライマーを用いて、逆転写ポリメラーゼ鎖反応 (RT-PCR) により c DNA を製造する方法が挙げられる。

ここでプライマーは、実施例1に具体的に示すマウス o b 蛋白レセプター c DNA の一部と相補的な配列を有するセンスプライマー S 1 及び S 2、アンチセンスプライマー A 3 及び A 4 が用いられる他、本発明で開示する第二番目の o b 蛋白レセプター遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定され、また常法により合成されるものをも使用することができる。尚、PCR 増幅により得られた c DNA は、常法に従って単離、精製することが出来る。

単離、精製方法としては、特に制限されないが例えばゲル電気泳動法等が挙げられる。

cDNAやRNAの調製に用いられる組織又は器官は、本発明のこれらの遺伝子を有するもので有れば、特に制限されない。具体的には、ラットの心臓、肺、脾臓、腎臓、睪丸、筋肉、脂肪組織、脾臓、小腸、肝臓などが挙げられる。

全RNAの調製、mRNAの分離・精製、cDNAの取得およびそのクローニングはいずれも常法に従って行うことができる。

cDNAライブラリーから本発明の遺伝子をスクリーニングする方法もまた常法に従って行うことが出来る。該スクリーニング方法としては、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等、及びこれらの組合せを例示することができる。

プローブとしては、本発明で開示する遺伝子配列情報をもとにして化学合成されるDNA配列、好ましくは放射性標識（例えば、 $[\alpha - ^{32}\text{P}]dCTP$ ）等でラベル化されたものを用いることができ、具体的には実施例3(1)で示されるものが例示される。

上記方法に従って得られる本発明の遺伝子、あるいは

各種DNA断片等の塩基配列の決定も、常法に従って行うことが出来る。例えば、ジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467 (1977)] や、マキサム-ギルバート法 [Method in Enzymology, 65, 499 (1980)] 等が挙げられる。また、かかる塩基配列の決定は、市販のシークエンスキット等を用いることにより、簡便に行うことが出来る。

また、本発明の遺伝子は、通常の遺伝子組換え技術によっても製造することができる。また、本発明の遺伝子を利用することにより、遺伝子組換え技術を用いて、¹⁰ o_b蛋白レセプター遺伝子生成物、つまり o_b蛋白レセプター（蛋白質）を製造・取得することができる。かかる蛋白質の製造は、本発明の遺伝子を有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを本発明の遺伝子が発現し得¹⁵ るような宿主細胞に導入して、該細胞、即ち形質転換体を培養することにより行うことが出来る。

ここで宿主細胞としては、原核生物及び真核生物のいずれをも使用することができる。該真核生物の細胞には、脊椎動物、酵母、昆虫などの細胞が含まれ、脊椎動物細²⁰胞としては、c o s (サル)、C H O (ハムスター) 等が例示される。

原核生物の宿主としては、通常大腸菌や枯草菌が用い

られる。これらを宿主として利用する場合、例えば該宿主中で複製可能なプラスミドベクターを用い、このベクター中に本発明の遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及びSD(シャイン・アンド・ダルガーノ)塩基配列、更にタンパク合成開始に必要な開始コドン(例えばATG)を付与した発現プラスミドを利用するのが好ましい。上記宿主としての大腸菌としては、エシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12株などが良く用いられ、ベクターとしては一般にpBR322及びその改良ベクターが良く用いられるが、特にこれらに限定されず、公知の各種の菌株およびベクターを用いることができる。プロモーターとしては、例えばトリプトファン(*trp*)プロモーター、*lpp*プロモーター、*la*_cプロモーター、PL/PRプロモーター等を使用することができる。

真核生物としては、酵母、特にサッカロマイセス属酵母が一般的に用いられる。該酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM82[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 1-5 (1983)]等を利用することができる。

脊椎動物の発現ベクターとしては、通常発現しようと

する遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列などを保有するものを使用でき、これは更に必要により複製起点を有していても良い。該発現ベクターの例としては、例えば、sv40の初期プロモーター有するpSV2dhfr [Mol. Cell. Biol., 1, 854 (1981)] 等が例示できる。

かくして得られる所望の組換えDNAの宿主細胞への導入方法及びこれによる形質転換法は、当業界で用いられる各種の手法が用いられる。また、得られる形質転換体は、常法に従って培養でき、該培養により本発明遺伝子によりコードされるοb蛋白レセプター（蛋白質）が発現・產生される。該培養に用いられる培地としては、採用する宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

かかる方法により製造されるοb蛋白レセプター蛋白は、必要に応じて、その物理的性質、化学的性質などを利用した各種の分離操作（「生化学データーブックII」、20 1175-1259頁、第1版第1刷、東京同人発行；Biochemistry, 25 (25), 8274-8277 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313-321 (1987)等参照）により分離、精製できる。

かくして、得られる蛋白質は、 α b 蛋白レセプターに対するモノクローナル抗体の作製に、また α b 蛋白レセプター測定の標準品として有用である。

また、本発明によって明らかにされた本発明の第一番目および第二番目の遺伝子の配列情報を基にし、これらの遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、各系統の温血動物、また温血動物の各組織における本発明遺伝子の発現を検出することができる。

具体的には、本発明の遺伝子の一部又は全部を有する DNA 配列を例えば放射性標識によりラベル化してプローブとし、ノーザンプロッティング解析 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] 等により実施することができる。

すなわち、本発明の第一番目又は第二番目の遺伝子は、その全部又は一部を用いることにより、本発明の第一番目又は第二番目の遺伝子を特異的に増幅／検出することができるプライマー／プローブとして有用である。

従って、本発明は、本発明の第一番目又は第二番目の遺伝子を特異的に増幅／検出することができるプライマー／プローブを提供するものもある。

また、本発明の第一番目の遺伝子は、その α b 蛋白レ

セプター遺伝子の変異型を発見、評価、検出するための対照（標準品）として有用である。

さらに、本発明は、肥満形質を発現する(*fa/fa*)温血動物に由来する本発明の第二番目の o_b 蛋白レセプター遺伝子の検出方法を提供する。

本発明の第二番目の o_b 蛋白レセプター遺伝子は、前述したように肥満表現型の温血動物に由来する遺伝子であり、その塩基配列の一部（塩基番号806位）が正常の温血動物の o_b 蛋白レセプター遺伝子と相違するものである。

本発明の方法は、かかる特定の相違（変異）を検出することを特徴とするものであり、これは、温血動物の o_b 蛋白レセプター遺伝子多型の遺伝子診断として有用である。また、この検出方法は、ひいては当該遺伝子を有する肥満表現型[(fa/fa) 型]の温血動物の検出、選別方法等に応用することができる。

かかる方法は、本発明によって明らかにされ且つ特徴付けられた前述の特定の変異を検出するものである限りにおいて、その手法等は特に制限されず、例えば常法である各種の方法を広く採用することができる。すなわち、本発明によって検出すべき遺伝子変異が明らかにされ、これが特定されている以上、その検出のための手法等は

本明細書の開示に従って当業者に適宜容易に採用することができる。

具体的な検出方法としては、(1)前述の特定された変異位置の塩基配列を解析する方法、(2)変異により5生じた物理化学的性質上の差や制限酵素部位の相違を利用する方法(例えば、本発明にかかる変異部位を含む適当なDNA試料におけるゲル電気泳動やキャピラリー電気泳動等の各種電気泳動手段等において、挙動の差を利用する方法)、(3)本発明にかかる変異の検出に適当10な検出用プローブを利用する方法等、及び(4)これらの組み合わせによる方法等が例示される。

本発明においては、特に変異によって○b蛋白レセプター遺伝子の塩基配列に新たに制限酵素認識部位(例えば、Hpa IIまたはMsp I認識部位等)が形成される15ことから、好適には、制限酵素サイトの相違を利用する方法が用いられる。具体的には、ラットの適当な組織のRNAからRT-PCRを用いてcDNAをクローニング、増幅して、得られたPCR生成物を制限酵素Hpa IIまたはMsp Iで消化し、該消化物を電気泳動により、20分画し、分画されたDNAのバンドをエチジウムプロマイト等で直接検出するか、又は適当なプローブを用いて検出する方法が挙げられる。

なお、PCRで用いられるプライマーとしては、前述したものが例示される。

またここで、用いられる検出用プローブは、被検DNA試料とのハイブリダイゼーションにおいて、採用する5 検出条件下で検出可能な程度の特異性を与えるものであれば、特に制限されない。

上記検出方法として、より具体的には、例えばサザンハイブリダイゼーション法及びドットハイブリダイゼーション法 [J. Mol. Biol., 98, 503-517 (1975)等] や、10 PCR (Polymerase chain reaction) - RFLP法 (Restriction fragment length polymorphism: 制限酵素断片長多型分析法)、PCR - SSCP法 (Single strand conformation polymorphism: 短鎖高次構造多型分析法、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 2766-2770 (1989)等)、15 PCR - SSO法 (Specific sequence oligonucleotide: 特異的配列オリゴヌクレオチド法)、PCR - SSO法とドットハイブリダイゼーション法とを用いる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド法 [ASO: allele specific oligomer; Nature, 324, 163-166 (1986)等] といったDNA增幅手法との組み合わせによる方法及びこれらの方法の組み合わせ等を例示することが出来る。中でもPCR法を組み合わせて利用する方法は、少量のDN

A 試料を利用して簡便且つ容易にしかも感度及び精度の高い検出が可能である点で、より好ましいものである。

簡便性の面からは、RFLP 法を利用した検出手段が好ましい。以下、この検出法を例としてより詳細に説明

5 する。

尚、上記検出法において、採用され得る各種の操作、例えば一部DNAの化学合成、DNAの切断、削除、付加乃至結合を目的とする酵素処理、DNAの単離、精製、複製、選択などはいずれも常法に従うことが出来る（分子遺伝学実験法、共立出版（株）1983年発行；PCRテクノロジー、宝酒造（株）1990年発行等）。例えば、DNAの単離精製は、アガロースゲル電気泳動法等に従うことができ、DNA配列の決定は、例えばジテオキシ法（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467 (1977)）やマキサム-ギルバード法（Method in Enzymology, 65, 499-560 (1980)）等に従うことができる。DNA塩基配列の決定は、市販のシークエンスキットなどを用いることによって容易に行うことができる。DNAの特定領域の增幅のためのPCR法もまた常法（例えば、Science, 230, 1350-1354 (1985)等）に従うことができる。これら各種の基本的操作は例えば本明細書で引用する文献においても採用されており、後述の実施例とともにこれら

の各文献が参照される。

本発明の遺伝子の検出において、測定対象であるゲノムDNAは、温血動物由来のサンプルであり、これを含むものであれば特に制限されない。例えば、血液、骨髓液、精液、腹腔液、尿などの体液；肝臓等の組織細胞；体毛などを利用することができる。ゲノムDNAは、これらサンプルより常法に従って抽出、精製し、調製することができる。

該ゲノムDNAより、本発明にかかる変異部位を含むDNA領域を増幅し、多量に且つ濃縮された被検体を得ることもできる。測定対象としては、この変異部位を含むDNA領域を増幅したものが特に好ましい。これは、例えば本発明の遺伝子の変異部位（塩基番号806位）を含む領域を特異的に増幅するように適宜設定したプライマーを採用して、PCR法に従い増幅することができる。かかるプライマーの設定は、常法に従って行うことが出来る。増幅する領域の塩基の長さ等にも特に制限はなく、通常100bpから2000bp程度とすることが出来る。

かかるプライマー設定の好適な一例としては、センスプライマー：5' - A A T C A C A T C T G C T G G T G T G A G - 3' (ラットοb蛋白レセプターcDNA

塩基配列 639 位から 659 位)、アンチセンスプライマー: 5' - C C A G T C A C T C C A G A C T C C T G - 3' (ラット o_b 蛋白レセプター cDNA 塩基配列 960 位から 941 位の配列に対する相補的配列) 等が 5 挙げられる。かかるプライマーによれば、本発明の遺伝子を含む特定の長さの増幅された DNA フラグメントとして上記所望の被検体を提供することができる。

上記のようにして PCR 法に従い増幅された所望の DNA 領域は、制限酵素 (例えば Hpa II または Msp I 10 等) により消化され、生成した切断断片は電気泳動により特定バンドとして確認される。

このようにして得られたバンドのパターンにより、 o_b 蛋白レセプター遺伝子の変異体 (本発明における第二番目の o_b 蛋白レセプター遺伝子) を検出することが出 15 来る。

またこの変異遺伝子の検出方法は、肥満形質を発現する温血動物 [(fa/fa) 型動物] の遺伝子診断法として有用である。

即ち、この検出方法は、当該変異遺伝子を有し肥満形 20 質を発現する (fa/fa) 型の温血動物を迅速に検出、選別する方法として応用することができる。また、このことは肥満症についての自然発症モデル動物 (疾患モデル動物、

例えばラット等)を、遺伝子的に安定にかつ確実に供給できる効果につながる。

通常、肥満疾患モデル動物は、そのホモ接合体 (fa/fa) は生殖能力がないため、 fa 遺伝子をもつヘテロ接合 5 体同士を掛け合わせて $((fa/Fa) \times (fa/Fa))$ 、得られたものの中から、約 $1/4$ の割合で生じる (fa/fa) 遺伝子を有するものを選別しなくてはならないが、従来は特にその選別手段がなかったため、実験モデル動物供給業者が同腹子と一緒に飼育して、その中で特別に肥満したもの 10 をある時点 (約 12 週令) で選別し、提供する形態が採られてきている。しかし、これでは、離乳後の環境要因等の後天的な影響を受け、遺伝的に安定した疾患モデル又は厳密な動物実験系を提供するには不適当である。即ち、RusselとBurchらの演出型説 (1959年) に鑑みれば、 15 遺伝的異常に基づく疾患モデル動物を安定に提供するためには、環境要因 (発生環境、近隣環境) の影響が入らぬよう環境的背景を充分コントロールする必要があるであろう。

本発明によれば、 αb 蛋白レセプター遺伝子に変異があるために肥満してしまう実験モデル動物を、環境的要因が加わる前、すなわち出生後にすぐに選別でき、遺伝的疾患モデル (肥満モデル) として厳密な動物実験系の 20

動物（例えば、ラット）を提供することができる。また、従来は（fa/fa）動物を1匹創出するためには、確率的に不要な3匹の動物を約12週まで飼育せねばならないのに対して、本発明はそのような飼育をする必要がないため実験動物供給者の動物飼育に伴うコストを削減できる点でも有用である。さらに、研究面においても、誕生直後の（fa/fa）動物（例えば、ラット等）の入手が可能となり、従来の方法では不可能であった誕生直後から肥満発症までの病態及び生理的解析が可能となる点で極めて有用である。

さらにまた、厳密な動物実験系の動物を提供するためには、特定の遺伝形質を有した疾患モデル動物が、その生育・生産及び供給の課程において、当初もっていた遺伝的均一性や特性を維持しているかを客観的に監視することも重要である。従って、本発明で開示する方法は、かかる疾患モデル動物の遺伝的モニタリングにも有用である。

尚、このような遺伝子検出／診断に際しては、本発明に関する変異の存在を検出するための試薬を有効成分として含有する診断剤を利用するのが好ましい。

かかる観点から、本発明は（fa/fa）型の温血動物由来。
b 蛋白レセプター遺伝子の検出用診断剤をも提供するも

のである。

かかる診断剤には、本発明の(fa/fa)型温血動物由来の
○b蛋白レセプター遺伝子の存在を検出するための方法
に応じた特異的試薬が必須成分として含有される。かかる
5 特異的試薬は、採用する検出方法に従い、適宜選択設
定され構成されるが、例えば、前述の検出用プローブと
してのDNA断片及び／又は特定の制限酵素（例えば、
Hpa II またはMsp I等）等の本発明にかかる変異を
特異的に検出するための手段に必要な試薬を含有するも
10 のとして特徴づけられる。

また、本発明で開示する変異に関する領域を特異的に
PCR增幅するための試薬、例えばそのために設定され
たプライマー等も、例えばハイブリダイゼーションのた
めの試薬類と同様に、本発明の診断剤に含ませることが
15 できる。

なお、本発明は前述するように、温血動物の肥満に関
連する遺伝子及び正常な動物を肥満に導く遺伝子の変異
に関する有用な情報を提供するものであり、かかる本発
明は、実験動物に限らず、温血動物一般の肥満化方法並
20 びに肥満形質を有する温血動物の提供につながるもので
ある。

図面の簡単な説明

図 1 は、ラット o b 蛋白レセプター c D N A のクローニング・ストラテジーを示すスキームである。なお、図中、黒枠はマウス o b 蛋白レセプター c D N A の翻訳領域 (coding region of mouse OB-R cDNA)を、太線は 5' 側と 3' 側の非翻訳領域を意味する。矢印は R T - P C R に使用したプライマーの相同領域を示す。S 1 及び S 2 は、それぞれマウス o b 蛋白レセプター c D N A の非翻訳領域及び翻訳領域と相同性を有するセンスプライマーであり、A 3 及び A 4 は、それぞれマウス o b 蛋白レセプター c D N A の翻訳領域及び非翻訳領域と相同性を有するアンチセンスプライマーである。

図 2 は、SD ラット (SD rat) および BALB/c マウス (BALB/c mouse) の肺由来の全 R N A の R T - P C R 生成物の電気泳動パターンを示す図面に代わる写真である。矢印は、ゲルから単離され、p U C 1 9 の H i n c II 消化物にクローンされた、増幅された o b 蛋白レセプター c D N A (約 1. 3 k b 及び 1. 6 k b) を示す。尚、図中 「Marker」 は、分子量のスタンダード標品を電気泳動したレーンを示す。また、図中 「S 1 - A 3」 はプライマーとして S 1 - A 3 を用いた R T - P C R 生成物の電気泳動のレーンを、「S 2 - A 4」 はプライマーとし

て S 2 - A 4 を用いた R T - P C R 生成物の電気泳動のレーンを示す。

図 3 は、 S D ラット由来の o b 蛋白レセプター c D N A の塩基配列（上段）及びそれから演繹されるアミノ酸配列（下段）を示す図である。塩基番号は、翻訳開始コドン中のアデニンを + 1 とし、またアミノ酸番号は、翻訳開始コドンによってコードされるメチオニンを + 1 として表した。塩基配列中、大文字は、マウス由来の o b 蛋白レセプター c D N A とは異なるヌクレオチドを意味する。▲は、推定されるシグナルペプチダーゼによる切断部位を示す。太線の下線領域は、推定される膜貫通ドメインを示す。二つの T r p - S e r - X (A s p 又は A s n) - T r p - S e r モチーフは細い下線で示す。黒枠で囲む「cag/Gln」は、Zucker(fa/fa)ラットと相違するコドン 2 6 9 位を示す。

図 4 は、 o b 蛋白レセプター c D N A の塩基番号 7 6 3 位から 8 3 7 位（アミノ酸番号 2 5 5 位から 2 7 9 位）の領域について、 S D ラットのヌクレオチド配列（上）と推定アミノ酸配列（下）について、マウスのものとヒトのものとを比較した図である〔上段：マウス（図中 mouse と表記）、中段： S D ラット（図中 rat と表記）、下段：ヒト（図中 human と表記）〕。マウスとヒトの配列は、

S D ラットと異なる配列のみを記載した。黒枠は、Zucker(fa/fa)ラットで変化した配列を示す。

図 5 は、S D ラット（図中、SD ratと表記）とZucker(fa/fa)ラット（図中、fa/fa ratと表記）の α b 蛋白レセプター c DNA の相違領域のヌクレオチド配列と推定されるアミノ酸配列を示す図である。相違するヌクレオチド及びアミノ酸を太字で示す。Zucker(fa/fa)ラットにおいて新たに出来た制限酵素 H p a II 部位をラインで示す。

図 6 は、種々系統のラット [S D ラット、Zucker(fa/fa)ラット、Wistar(fa/fa)ラット] の肺 RNA の RT - PCR 生成物を H p a II 消化後、電気泳動に供した電気泳動パターンを示す図面に代わる写真である。矢印は、制限酵素 H p a II の消化により切断されなかった RT - PCR 生成物（約 600 bp）及び切断された RT - PCR 生成物（約 430 bp 及び 170 bp）を示す。尚、図中、no digestion とは未消化物を、Hpa II digestion は制限酵素 H p a II による消化物を意味する。また、lean littermate of Zucker(fa/fa) とは、Zucker(fa/fa) ラットの同腹子を、lean littermate of Wistar (fa/fa) とは、Wistar(fa/fa) ラットの同腹子を意味する。

図 7 は、種々系統のラット（レーン左側から、Zucker

(fa/fa)ラット、同腹子No. 1、同腹子No. 2、同腹子No. 3、同腹子No. 4、Wistarラット、SDラット]の染色体DNAの各種制限酵素による消化物を電気泳動した後、ラットοb蛋白レセプターcDNAフラグメントをプローブとしてプロットハイブリダイゼーションした結果を示す図面に代わる写真である。

なお、消化に使用された制限酵素は、EcoRI(図A)、HindIII(図B)、BamHI(図C)及びPstI(図D)である。

図8においてAはZucker(fa/fa)ラットの種々の組織でのοb蛋白レセプターmRNAの発現レベル、具体的には、Zucker(fa/fa)ラットの同腹子No. 4のさまざまな組織から単離した全RNA(13μg)を電気泳動し、ラットοb蛋白レセプター cDNAプローブでハイブリダイズした膜のエチジウムプロミド蛍光をオートラジオグラムで示す図面に代わる写真である。尚、左レンから、脳(brain)、心臓(heart)、肺(lung)、脾臓(spleen)、腎臓(kidney)、睾丸(testis)、筋肉(muscle)、脂肪組織(adipose tissue)、胰臓(pancreas)、小腸(small intestine)、肝臓(liver)を意味する。

また、図8中Bは、種々系統のラットの脳及び肺でのοb蛋白レセプターmRNAの発現レベル、具体的には、

S D ラット、Zucker(fa/fa)ラット及びZucker(fa/fa)ラットの同腹子(lean littermate)No. 4の脳(brain)と肺(lung)に由来する全RNAを同様に電気泳動し、ハイブリダイズした結果を示す図面に代わる写真である。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

10 ラット由来のοb蛋白レセプターcDNAのクローニング

S D (Sprague-Dawley)ラット(雄、日本SLC株式会社)、Zucker(fa/fa)ラット(雄、Kiwa Laboratory Animals Co., Ltd)及びBALA/cマウス(雄、日本SLC株式会社)の肺に由来する全RNAを用いて、RT-PCR法を利用して、これらのοb蛋白レセプター-cDNAをクローニングした。

(1) 全RNAの調製

ラットの肺組織を、4. 4 M グアニジン・チオシアネット、0. 1 M β -メルカプトエタノール及び25 mMクエン酸ナトリウムを含む溶液(pH 7)中でホモジナイズし、続いて5. 7 M CsClを添加して遠心

(140,000×g、1020分間)することにより、全RNAを調製した(Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 5 Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W. J., and Goodman, H. M. (1977) Science 196, 1313-1319)。

(2) RT-PCRを用いたラットοb蛋白レセプターcDNAのクローニング

10 (i) cDNAの調製

(1)で調製した各種ラットの肺由来の全RNAを用いて、逆転写ポリメラーゼ鎖反応を行い、cDNAを調製した。

具体的には、まず(1)で調製した全RNA(10μg)を逆転写用の反応混液(10μl: 50mMトリス(pH 8.3)、50mM KCl、8mM MgCl₂、5mM ジチオスレイトール、各dNTPを20mMずつ、RNase阻害剤を50ユニット(プロメガ・コーポレーション(Promega Corporation)、マジソン(Madison)、ウイスコンシン州(Wiscon)、U.S.A.)、オリゴ(dT)₁₇ 50pmol、及びアビアン・ミエロプラストシス・ヴァイラスリバース・トランスクリプタ

一ゼ X L 17 ユニット [avian myeloblastosis virus -reverse transcriptase XL: ライフサイエンス社 (Life Science inc.,) 製] 中で 42 °C、2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、かかる混液を 98 °C 5 で 10 分間加熱して、反応を停止して、cDNA を調製した。

(ii) cDNA の増幅 (PCR 法)

ついで、得られた cDNA を増幅させるために、上記の逆転写反応混液 (1 μl)、各 200 μM の dNTP 10 s (デオキシヌクレオシドホスフェート) 0.5 ユニットの Perfect Match® PCR Enhancer (ストラタジーン・クローニング・システムズ社 (Stratagene Cloning Systems) 製)、2.5 ユニットの TaKaRa LA Taq DNA ポリメラーゼ (タカラ酒造株式会社製) 及び各アンチセンス・ 15 キナーゼ・プライマーを 17 pmol 含む反応液 (50 μl) を用いて、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) を行った。

プライマーとして、2 セットのプライマー、S1-A 3 (センスプライマー S1 とアンチセンスプライマー A 20 3 からなる) 及び S2-A4 (センスプライマー S2 とアンチセンスプライマー A4 からなる) を使用して、PCR を行った。

プライマー S 1 と A 4 は、マウス o b 蛋白レセプター cDNA の 5' 又は 3' 側の非翻訳領域に特異的であり、S 2 と A 3 はその翻訳領域に特異的である（図 1 参照）。センスプライマー S 1 は 30 塩基の長さであり、翻訳開始部位であるアデニンから、-30 から -1 の残基、G C A A A A T C C A G G T G T A C A C C T C T G A A G A A A A G から構成されている。センスプライマー S 2 は 30 塩基の長さであり、塩基番号 1 1 3 9 から 1 1 6 8 の残基、G C A T T G T G A G T G A C C G A G 10 T T A G C A A A G T T A から構成されている。アンチセンスプライマー A 3 は 30 塩基長さであり、塩基番号 1 2 4 2 から 1 2 1 3 残基、C T G C T C A T T G C A G C A G T A C A C T G C G T C A T A から構成されている。アンチセンスプライマー A 4 は、30 塩基長さで 15 あり、塩基番号 2 7 1 6 から 2 6 8 7 残基、T T G G G T T C A T C T G T A G T G G T C A T G A G A G A C から構成されている。

PCR は、GeneAmp® PCR システム 9600 [パーキンエルマー・コーポレーション (Perkin-Elmer Corp.,) 製] を用いて、96 °C で 40 秒間、65 °C で 40 秒間、72 °C で 100 秒間の反応を 35 サイクル実施することにより行った。

実施例 2ラット由来の α b 蛋白レセプター c DNA の塩基配列の
解析

5 (1) SD ラット由来の α b 蛋白レセプター c DNA の
塩基配列

実施例 1 で得られた PCR 生成物をアガロースゲル中
で電気泳動にかけて分画した。図 2 に、SD ラットおよ
び BALB/c マウスの α b 蛋白レセプター c DNA の
10 PCR 生成物の電気泳動パターンを示す。

該ゲルから、SUPRECTM (タカラ酒造株式会社製)
を用いることにより、約 1.3 キロベース (kb) の P
CR 生成物 (S1-A3) 及び約 1.6 kb の PCR 生成物
15 (S2-A4) を単離して、それをプラスミド pUC
19 の HincII 消化物の中にクローンした。

次いで、SD ラット由来の α b 蛋白レセプター c DNA の塩基配列を、該ベクターもしくはラット α b 蛋白レ
セプター c DNA 配列に相同性のある合成オリゴヌクレ
オチド・プライマー (pUC19 のクローニングサイト
20 に隣接した RV-M、M13-20 (タカラ酒造株式会
社製) を用いて、プライマー延伸によって
塩基配列を決定して常法により調製したもの。) を用い

て、A B I 3 7 3 A 自動DNAシークエンシング・システム（パーキン＝エルマー株式会社）により、ジデオキシヌクレオチドチェイン・ターミネーション法で決定した [Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467; Adams, M. D., Fields, C., Venter, J. C. (1994) *Automated DNA Sequencing and Analysis*, Academic Press, London]。

結果を図3に示す。なお、配列中の下段は得られた塩基配列から演繹されるSDラットの α b蛋白レセプターのアミノ酸配列を示す。かかる配列から、gp130のようなサイトカインレセプター・クラスIの中で保存されているTrp-Ser-X-Trp-Serモチーフの二つのコピーがラット α b蛋白レセプターcDNA中に存在していることが分かった（図3、細い下線領域）。

塩基配列中、塩基番号763位から837位の領域（アミノ酸番号263位から277位）について、SDラット、マウス及びヒトの間で比較した結果を図4に示す。図4から分かるように、かかる領域において、塩基配列及びアミノ酸配列の両者がともに良く保存されていた。

(2) Zucker(fa/fa)ラット由来の α b蛋白レセプターc

D N A の 塩 基 配 列

(1) と同様にして、Zucker(fa/fa)ラット由来の o. b 蛋白レセプター c D N A を P C R で増幅し、その塩基配列を決定した。その結果、塩基番号 806 位がアデニン 5 ではなくシトシンである点を除いては、すべて図 3 で示す S D ラット由来の o. b 蛋白レセプター c D N A の塩基配列と同一であった。塩基配列において、806 位のヌクレオチド変化することにより、Zucker(fa/fa)ラット由来の c D N A 配列において、新たに制限酵素 H p a II が 10 形成され（図 5）、またこの変化により該ヌクレオチドに対応するコドン 269 は、S D ラットがグルタミンであるのに対し、Zucker(fa/fa)ラットでは、プロリンになっていた（図 5）。

(3) ラット o. b 蛋白レセプター c D N A の制限酵素 H 15 p a II 消化による解析

(2) で示したヌクレオチドの変化が、実際に存在しているのか否かを確認するために、種々の株に由来するラット（S D ラット、Zucker(fa/fa)ラット、Zucker(fa/f a)ラットの同腹子（No. 1 ~ 4）、Wistar ラット、Wis 20 tar(fa/fa)ラット、Wistar(fa/fa)ラットの同腹子（No. 1 ~ 4）] の肺の R N A s についてプライマー S 15 及び A 3 を使用して、実施例 1 (1) で行った方法に従っ

て R T - P C R を行った。

センスプライマー S 1 5 は 2 1 塩基の長さで、ラット o b 蛋白レセプター c D N A の 6 3 9 残基から 6 5 9 残基までの配列に特異的なヌクレオチド配列、 A A T C A 5 C A T C T G C T G G T G T G A G を有する。 P C R は、 9 6 °C で 3 0 秒、 5 7 °C で 3 0 秒、 および 7 2 °C で 6 0 秒の反応を 3 0 サイクル実施することにより行った。 P C R 後、得られた生成物を、順次フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿に供した。該サンプルを 10 制限酵素 H p a I I もしくは M s p I で消化し、アガロースゲルの電気泳動にかけて分画した。

もし、得られた R T - P C R 生成物（約 6 0 0 b p ）が、 8 0 6 位付近に H p a I I 切断部位を含んでいるならば、 H p a I I 消化の結果として約 4 3 0 b 及び 1 7 0 b 15 p の切断されたフラグメントが生成することが期待される。

結果を図 6 に示す。 Z u c k e r (f a / f a) ラット及び W i s t a r (f a / f a) ラット由来の R T - P C R 生成物はほとんど完全に H p a I I 消化により断片化された。 S D ラット由来の 20 R T - P C R 生成物及び Z u c k e r (f a / f a) ラットの同腹子 N o. 1 は H p a I I 消化に抵抗性を示した。他の Z u c k e r (f a / f a) ラット及び W i s t a r (f a / f a) ラットの同腹子由来の R

T - P C R 生成物は、 H p a II 消化により部分的に断片化された。また、制限酵素 H p a II と同じ配列を認識する M s p I で消化することによっても、同じ結果が得られた。

5 これらの結果は、 f a / fa ラットの 8 0 6 位のヌクレオチドはシトシンであり、アデニンでないことを示している。また、この変化により塩基番号 8 0 6 位付近に制限酵素 H p a II もしくは M s p I の認識部位が形成されることが明らかになった。

10 さらにこれらの結果は、 Zucker(fa/fa) ラットの同腹子 No. 1 の遺伝子型 (genotype) はホモ Fa/Fa [非肥満形質 (優性形質) の同型接合体] であり、 Zucker(fa/fa) ラットの他の同腹子及び Wistar(fa/fa) ラットの同腹子の遺伝子型がヘテロ Fa/fa [非肥満形質と肥満形質 (劣性形質) 15 の異型接合体] であることを示唆している。

実施例 3

ラット o b 蛋白レセプター c D N A フラグメントの D N A 分析及び R N A 分析プローブとしての利用

20 (1) ラベル化プローブの調製

実施例 2 (1) で調製したプラスミドベクターからラット o b 蛋白レセプター c D N A フラグメント (S 1 と

A 3、S 2 と A 4 から作製したものを同量混ぜて用いた)を切斷して、 $[\alpha - P^{32}]$ d C T P を用いて、常法に従って放射性標識化を行い、ラベル化プローブを調製した(Anal. Biochem., 132, 6-13 (1983); Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press,]。

(2) 数種系統のラット染色体DNAのプロットハイブリダイゼーション

Wistarラット、SDラット、Zucker(fa/fa)ラット及び10その同腹子を含む種々の系統のラットの染色体DNAを用いた。DNAはこれらのラットの肝臓から、プロテナーゼK消化、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を逐次(連続的に)行うことにより抽出した(Nucleic Acids Res. 3, 2303-2308 (1976))。

15 得られたDNA(5 μ g)をEcoRI、HindII、BamHI又はPstIで完全に消化し、0.7%アガロースゲル中で分離した後、HybondTM-Nナイロンハイブリダイゼーション膜(アマシャム・インターナショナル社製)に移した(J. Mol. Biol. 98, 503-51207 (1975))。該膜を(1)で調製した $[\alpha - ^{32}P]$ d C T P ランダムプライミング・ラベル化ラット α b蛋白レセプター-cDNAプローブでハイブリダイズし、正確に、

0.5 × 希釈の標準クエン酸生理食塩水 (SSC; 1 × SSC は 150 mM NaCl、15 mM クエン酸ナトリウムからなる)、0.1% 硫酸ドテシルナトリウム (SDS) で 68°C 下で洗浄し、X線フィルムに曝した。

5 結果を図 7 に示す。図 7 に示すように、EcoRI 消化で生成した約 6 kb、4 kb 及び 0.7 kb のフラグメント (図 7 A)、BamHI 消化で生成した約 25 kb 及び 10 kb のフラグメント (図 7 C)、HindII I 消化で生成した約 8 kb、2.5 kb 及び 1.5 kb の 10 フラグメントを含む 7 つ以上の DNA フラグメント (図 7 B)、及び PstI 消化で生成した 10 kb、6 kb、3 kb 及び 2 kb のものを含む 8 つ以上の DNA フラグメント (図 7 D) が、 $[\alpha - \text{P}^{32}] \text{dCTP}$ ラベル化。
b 蛋白レセプター c DNA プローブとハイブリダイズし 15 た。

7 種類のラット株間で、ハイブリダイズ・バンドのパターンには違いは見られず、これらのラット株には、。
b 蛋白レセプター 遺伝子の明らかな構造変化は見られなかった。

20 (3) ラットの様々な組織での mRNA の発現レベル Zucker(fa/fa) ラットの同腹子 No. 4 を用いて、その様々な組織 (脳、心臓、肺、脾臓、腎臓、睪丸、筋肉、

脂肪組織、脾臓、小腸、肝臓)に由来する全RNAを実施例1(1)に従って調製した。

次いで得られた全RNAs(13 μ g)を50%ホルムアミド、2.2Mホルムアルデヒド中に、65°C下で15分間置いて変性させ、そして2.2Mのホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルを用いた電気泳動にかけた。そして該ゲルをHybondTM-Nナイロンハイブリダイゼーション膜(アマシャム・インターナショナル社製)にプロッティングした。該膜を(1)で調製した[α -³²P]dCTPランダムプライミング・ラベルした。b蛋白レセプターcDNAフラグメントプローブでハイブリダイズし、0.1%硫酸ドテシルナトリウム(SDS)を含有する0.5倍希釈の標準クエン酸生理食塩水(SSC; 1×SSCは150mM NaCl、15mMクエン酸ナトリウムからなる)で68°C下で洗浄し、X線フィルムに曝した。

結果を図8に示す。ハイブリダイゼーションシグナルは脳、肺、脾臓、脂肪細胞、小腸及び肝臓由来のRNAにはっきりと観察された。これらのうち、特に脾臓は。20b蛋白レセプターmRNAを高いレベルで発現していた(図8A)。

引き続いて、SDラット、Zucker(fa/fa)ラット及びZ

ucker(fa/fa)ラットの同腹子No. 4のいくつかの脳および肺における α b蛋白レセプターmRNAの発現レベルについて、同様にして測定した。これらの器官については、ラット間において、 α b蛋白レセプターmRNAの発現レベルの違いは見られなかった(図8B)。ゲルの各レーンにおけるRNA量は、エチジウムプロマイド蛍光による検出、また、ナイロンハイブリダイゼーション膜にRNAを移した後に、ゲルから18Sと28SDNAに特異的なバンドを直接的に同定することにより、一定であると判断された。なお、定量には、バイオイメージ・アナライザ-BAS 2000(富士フィルム株式会社製)を使用した。

実施例4

15 制限酵素Hpa II消化による変異型ラット α b蛋白レセプター遺伝子の検出

実施例3で増幅・調製したSDラット、Zucker(fa/fa)ラット、Wistarラット、Wistar(fa/fa)ラットの肺由来のPCR反応物(cDNA)10 μ lを用いて、これに制限酵素緩衝液1 μ l及び制限酵素Hpa IIを1 μ l加え、20 37°Cで一晩消化した後、2%アガロースゲル電気泳動にかけ、変異遺伝子の判定を以下のように行った。

即ち、P C Rに際して、センスプライマーとしてS 1
5 (ラットο b 蛋白レセプター c D N Aの塩基番号6 3
9から6 5 9残基までの配列に相同意のあるヌクレオチ
ド配列、A A T C A C A T C T G C T G G T G T G A G)、
5 アンチセンスプライマーとしてA 3 (ラットο b 蛋白レ
セプター c D N Aの塩基番号1 2 4 2から1 2 1 3残基
までの配列に相同意のあるヌクレオチド配列、C T G C
T C A T T G C A G C A G T A C A C T G C A T C A T
A)を用いてP C Rを行うと、各 c D N Aの対応する塩
10 基配列を有する約6 0 0 b pの断片が増幅される。

かかる断片を、制限酵素H p a II消化した後、2%ア
ガロースゲル電気泳動にかけると、塩基番号8 0 6位が
シトシンに変異したZucker(fa/fa)ラット及びWistar(fa
/fa)ラット由来のc D N Aは、4 3 0 b p及び1 7 0 b
15 pの断片のバンドが観察された。一方、SDラット及び
Wistarラット由来のc D N Aは、分解されず6 0 0 b p
断片のバンドが観察された。

実施例5

20 ヘテロ(fa/Fa)同士を掛け合わせた子ラットの尾から微
量の血液を採取して常法に従ってD N Aを抽出する。次
にラットο b 蛋白レセプター c D N Aの塩基配列に基づ

いて、塩基番号 806 位のヌクレオチドを含むように、適宜 P C R プライマーのペアを合成する。このプライマーを用いて常法に従って、P C R を実施する。増幅したフラグメントを、制限酵素 H a p II で消化・切斷して、

5 電気泳動にかけて、図 6 に示すと同様に、fa 遺伝子のホモ (fa/fa)、あるいはヘテロ (fa/Fa)、もしくは正常型のホモ (Fa/Fa) をその切斷パターンから判定する。

以上の実施例から、H p a II 消化による制限フラグメントの長さの違いに基づいて、変異型 o b 蛋白レセプター遺伝子の存在を検出することができ、この方法が、ラットの生後すぐもしくは離乳前に Zucker ラットや Wistar ラットの肥満症の遺伝子型 (fa/fa) を検出するのに有用であることが示された。

15

産業上の利用可能性

本発明は o b 蛋白レセプターの遺伝子を提供する。また本発明は、肥満の表現形質を発現する、温血動物に由来する o b 蛋白レセプターの遺伝子の突然変異体を明らかにし、かかる変異型遺伝子を提供する。かかる遺伝子情報は、遺伝子ダーゲッティング等の方法によるこれらの遺伝子破壊動物の作成等、家畜を始めとする温血動物を早期に肥満させる方法において有用である。

更に本発明は、肥満形質を発現する温血動物に由来する。⁵ b 蛋白レセプター遺伝子（変異型）を検出する方法を提供する。当該方法によれば、肥満を自然発症するモデル動物を迅速に検出することが可能となり、これは肥満のメカニズムや関連疾患の病因を解明するために使用される疾患モデル動物の生産及び供給に有用である。

10

15

20

Ile Glu Cys Trp Met Lys Gly Asp Leu Thr Leu Phe Ile Cys His Met
130 135 140
Glu Pro Leu Leu Lys Asn Pro Phe Lys Asn Tyr Asp Ser Lys Val His
145 150 155 160
5 Leu Leu Tyr Asp Leu Pro Glu Val Ile Asp Asp Leu Pro Leu Pro Pro
165 170 175
Leu Lys Asp Ser Phe Gln Thr Val Gln Cys Asn Cys Ser Val Arg Glu
180 185 190
Cys Glu Cys His Val Pro Val Pro Arg Ala Lys Val Asn Tyr Ala Leu
10 195 200 205
Leu Met Tyr Leu Glu Ile Thr Ser Ala Gly Val Ser Phe Gln Ser Pro
210 215 220
Leu Met Ser Leu Gln Pro Met Leu Val Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu
225 230 235 240
15 Gly Leu Arg Met Glu Val Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp
245 250 255
Asp Ser Gln Thr Lys Ala Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr
260 265 270
Leu Glu Asn Ser Thr Ile Val Arg Glu Ala Ala Glu Ile Val Ser Asp
20 275 280 285
Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Val Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val
290 295 300

Gln Val Arg Ser Lys Arg Leu Asp Gly Ser Gly Val Trp Ser Asp Trp
 305 310 315 320
 Ser Leu Pro Gln Leu Phe Thr Thr Gln Asp Val Met Tyr Phe Pro Pro
 325 330 335
 5 Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Ala Ser Phe Cys Cys Ile Tyr
 340 345 350
 Lys Asn Glu Asn Gln Thr Ile Ser Ser Lys Gln Ile Val Trp Trp Met
 355 360 365
 Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Glu Thr Gln Tyr Asn Thr Val Ser Asp
 10 370 375 380
 His Ile Ser Lys Val Thr Phe Ser Asn Leu Lys Ala Thr Arg Pro Arg
 385 390 395 400
 Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu Gln Ala Cys
 405 410 415
 15 His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile
 420 425 430
 Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser
 435 440 445
 Pro Ser Thr Ile Gln Ser Leu Val Gly Ser Thr Val Gln Leu Arg Tyr
 20 450 455 460
 His Arg Arg Ser Leu Tyr Cys Pro Asp Asn Pro Ser Ile Arg Pro Thr
 465 470 475 480

Ser Glu Leu Lys Asn Cys Val Leu Gln Thr Asp Gly Phe Tyr Glu Cys

485 490 495

Val Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg

500 505 510

5 Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu

515 520 525

Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Asn Val Lys Ala Glu

530 535 540

Ile Thr Ile Asn Thr Gly Leu Leu Lys Val Ser Trp Glu Lys Pro Val

10 545 550 555 560

Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Asn Gly

565 570 575

Lys Glu Ile Gln Trp Lys Thr His Glu Val Phe Asp Ala Lys Ser Lys

580 585 590

15 Ser Ala Ser Leu Pro Val Ser Asp Leu Cys Ala Val Tyr Val Val Gln

595 600 605

Val Arg Cys Arg Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser

610 615 620

Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Val Met Asp Val Lys Val Pro Met Arg Gly

20 625 630 635 640

Pro Glu Phe Trp Arg Ile Met Asp Gly Asp Ile Thr Lys Lys Glu Arg

645 650 655

Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys
 660 665 670
 Ser Val Arg Arg Tyr Val Val Lys His Arg Thr Ala His Asn Gly Thr
 675 680 685
 5 Trp Ser Gln Asp Val Gly Asn Gln Thr Asn Leu Thr Phe Leu Trp Ala
 690 695 700
 Glu Ser Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala
 705 710 715 720
 Ser Leu Val Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val
 10 725 730 735
 Asn Ala Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val
 740 745 750
 Ile Leu Ser Trp Thr Leu Ser Pro Asn Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu
 755 760 765
 15 Val Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Asp Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu
 770 775 780
 Arg Ile Pro Ser Asn Val Asn Lys Tyr Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile
 785 790 795 800
 Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly
 20 805 810 815
 Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Asp Ile Ala
 820 825 830

Lys Gln Gln Asn Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Ile Ile Ile

835

840

845

Ser Ser Cys Val Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His Gln Arg

850

855

860

5 Met Lys Lys Leu Phe Trp Asp Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn Cys Ser

865

870

875

880

Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Ala Asp Thr Leu***

885

890

10 配列番号：2

配列の長さ：2685

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

15 配列の種類：DNA (cDNA)

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..2682

特徴を決定した方法：S

20 配列：

ATGACGTGTC AGAAATTCTA TGTGGTTTG TTACACTGGG AATTCTGTA TGTGATAACT 60

GCACCTAACCG TGGCCTATCC AACCTCTCCC TGGAGATTAA AGCTGTTTG TGCGCCACCG 120

AGTACAACTG ATGACTCCTT TCTCTCTCCT GCTGGAGTCC CAAACAATAC TTCGTCTTG 180
AAGGGGGCTT CTGAAGCACT TGTGAAGCT AAATTTAATT CAACTGGTAT CTACGTTCT 240
GAGTTATCCA AAACCATTTC CCACTGTTGC TTTGGGAATG AGCAAGGTCA AACTGCTCC 300
GCACTCACAG GCAACACTGA AGGGAAGACG CTGGCTTCAG TGGTGAAGCC TTTAGTTTC 360
5 CGCCAACTAG GTGTAAACTG GGACATAGAG TGCTGGATGA AAGGGGACTT GACATTATTC 420
ATCTGTCATA TGGAACCATT ACTTAAGAAC CCCTTCAAGA ATTATGACTC TAAGGTTCAC 480
CTTTTATATG ATCTGCCCTGA AGTTATAGAT GATTGCCTC TGCCCCACT GAAAGACAGC 540
TTTCAGACTG TCCAGTGCAA CTGCAGTGT CGGGAAATGCG AATGTCATGT ACCAGTACCC 600
AGAGCCAAAG TCAACTACGC TCTTCTGATG TATTTAGAAA TCACATCTGC TGGTGTGAGT 660
10 TTTCAGTCAC CTCTAATGTC ACTGCAGCCC ATGCTTGTG TGAAGCCCGA TCCACCGCTG 720
GGTTTGCCTA TGGAAGTCAC AGATGATGGT AATTTAAAGA TTTCATGGGA CAGCCAAACA 780
AAAGCACCATT TTCCACTTCA ATATCAGGTG AAATATTTAG AGAATTCTAC AATCGTAAGA 840
GAGGCTGCTG AAATCGTCTC GGATACATCT CTGCTGGTAG ACAGCGTGCT TCCTGGGTCT 900
TCATACGAGG TCCAGGTGAG GAGCAAGAGA CTGGATGGCT CAGGAGTCTG GAGTGAUTGG 960
15 AGTTTACCTC AACTCTTAC CACACAAGAT GTCAATGTATT TTCCACCCAA AATTCTGACG 1020
AGTGTGGAT CCAATGCTTC CTTTGCTGC ATCTACAAA ATGAGAACCA GACTATCTCC 1080
TCAAAACAAA TAGTTGGTG GATGAATCTA GCCGAGAAGA TCCCCGAGAC ACAGTACAAC 1140
ACTGTGAGTG ACCACATTAG CAAAGTCACT TTCTCCAACC TGAAAGCCAC CAGACCTCGA 1200
GGGAAGTTA CCTATGATGC AGTGTACTGC TGCAATGAGC AGGCATGCCA TCACCGCTAC 1260
20 GCTGAATTAT ATGTGATCGA TGTCAATATC AATATATCAT GTGAAACTGA CGGGTACTTA 1320
ACTAAAATGA CTTGCAGATG GTCACCCAGC ACAATCCAAT CACTAGTGGG AAGCACTGTG 1380
CAGTTGAGGT ATCACAGGGC CAGCCTGTAC TGTCCCGATA ATCCATCTAT TCGTCCTACA 1440

TCAGAGCTCA AAAACTGCGT CTTACAGACA GATGGCTTT ATGAATGTGT TTTCCAGCCA 1500
ATCTTCTAT TATCTGGCTA TACAATGTGG ATCAGGATCA ACCATTCTT AGGTTCACTT 1560
GACTCTCCAC CAACGTGTGT CCTTCCTGAC TCCGTAGTAA AACCACTACC TCCATCTAAT 1620
GTAAAAGCAG AGATTACTAT AAACACTGGA TTATTGAAAG TATCTTGGGA AAAGCCAGTC 1680
5 TTTCCAGAGA ATAACCTCA GTTCCAGATT CGATATGGCT TAAATGGAAA AGAAATACAA 1740
TGGAAAGACAC ACGAGGTATT CGATGCAAAA TCAAAATCGG CCAGCCTGCC AGTGTCAAGAT 1800
CTCTGTGCGG TCTATGTGGT ACAGGTTCGC TGCCGGCGGT TGGATGGACT AGGGTATTGG 1860
AGTAATTGGA GCAGTCCAGC CTACACTCTT GTCATGGATG TAAAAGTTCC TATGAGAGGG 1920
CCTGAATTCT GGAGAATAAT GGATGGGGAT ATTACTAAAA AGGAGAGAAA TGTCACCTTG 1980
10 CTTTGGAAAGC CACTGATGAA AAATGACTCA CTGTGTAGTG TGAGGAGGTA TGTGGTGAAG 2040
CATCGTACTG CCCACAATGG GACATGGTCA CAAGATGTGG GAAATCAGAC CAATCTCACT 2100
TTCCTGTGGG CAGAATCAGC ACACACTGTT ACAGTTCTGG CCATCAATTG CATCGGTGCC 2160
TCCCTTGTGA ATTTAACCT TACGTTCTCA TGGCCCATGA GTAAAGTGAA TGCTGTGCAG 2220
TCACTCAGTG CTTATCCCCT GAGCAGCAGC TGGGTGATCC TTTCTGGAC ACTGTCACCT 2280
15 AATGATTATA GTCTGTTATA TCTGGTTATT GAATGGAAGA ACCTTAATGA TGATGATGGA 2340
ATGAAGTGGC TTAGAATCCC TTCGAATGTT AACAAAGTATT ATATCCATGA TAATTTATT 2400
CCTATCGAGA AATGTCAGTT TAGTCTTAC CCAGTATTG TGGAAGGAGT TGGAAAACCA 2460
AAGATAATTA ATGGTTTCAC CAAAGATGAT ATGCCAACAC AGCAAAATGA TGCAGGGCTG 2520
TATGTCATTG TACCGATAAT TATTCCTCT TGTGTCTGC TGCTCGAAC ACTGTTAATT 2580
20 TCACACCAGA GAATGAAAAAA GTTGTGTTGG GACGATGTTG CAAACCCCAA GAATTGTTCC 2640
TGGGCACAAG GACTTAATTG CCAAAAGAGA CGGGACACTC TTTGA 2685

配列番号：3

配列の長さ：894

codon

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

5 配列：

Met	Thr	Cys	Gln	Lys	Phe	Tyr	Val	Val	Leu	Leu	His	Trp	Glu	Phe	Leu	
					5			10							15	
Tyr	Val	Ile	Thr	Ala	Leu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Pro	Thr	Ser	Pro	Trp	Arg	
					20			25							30	
10	Phe	Lys	Leu	Phe	Cys	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Thr	Asp	Asp	Ser	Phe	Leu
					35			40							45	
Ser	Pro	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu	Lys	Gly	Ala	Ser	
					50			55							60	
Glu	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Lys	Phe	Asn	Ser	Thr	Gly	Ile	Tyr	Val	Ser	
15	65			70						75					80	
Glu	Leu	Ser	Lys	Thr	Ile	Phe	His	Cys	Cys	Phe	Gly	Asn	Glu	Gln	Gly	
				85				90							95	
Gln	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Thr	Gly	Asn	Thr	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Ala	
				100			105								110	
20	Ser	Val	Val	Lys	Pro	Leu	Val	Phe	Arg	Gln	Leu	Gly	Val	Asn	Trp	Asp
				115			120								125	
Ile	Glu	Cys	Trp	Met	Lys	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Phe	Ile	Cys	His	Met	

130 135 140
Glu Pro Leu Leu Lys Asn Pro Phe Lys Asn Tyr Asp Ser Lys Val His
145 150 155 160
Leu Leu Tyr Asp Leu Pro Glu Val Ile Asp Asp Leu Pro Leu Pro Pro
5 165 170 175
Leu Lys Asp Ser Phe Gln Thr Val Gln Cys Asn Cys Ser Val Arg Glu
180 185 190
Cys Glu Cys His Val Pro Val Pro Arg Ala Lys Val Asn Tyr Ala Leu
195 200 205
10 Leu Met Tyr Leu Glu Ile Thr Ser Ala Gly Val Ser Phe Gln Ser Pro
210 215 220
Leu Met Ser Leu Gln Pro Met Leu Val Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu
225 230 235 240
Gly Leu Arg Met Glu Val Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp
15 245 250 255
Asp Ser Gln Thr Lys Ala Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Pro Val Lys Tyr
260 265 270
Leu Glu Asn Ser Thr Ile Val Arg Glu Ala Ala Glu Ile Val Ser Asp
275 280 285
20 Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Val Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val
290 295 300
Gln Val Arg Ser Lys Arg Leu Asp Gly Ser Gly Val Trp Ser Asp Trp

305	310	315	320
Ser Leu Pro Gln Leu Phe Thr Thr Gln Asp Val Met Tyr Phe Pro Pro			
325	330	335	
Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Ala Ser Phe Cys Cys Ile Tyr			
5	340	345	350
Lys Asn Glu Asn Gln Thr Ile Ser Ser Lys Gln Ile Val Trp Trp Met			
355	360	365	
Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Glu Thr Gln Tyr Asn Thr Val Ser Asp			
370	375	380	
10 His Ile Ser Lys Val Thr Phe Ser Asn Leu Lys Ala Thr Arg Pro Arg			
385	390	395	400
Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu Gln Ala Cys			
405	410	415	
His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile			
15	420	425	430
Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser			
435	440	445	
Pro Ser Thr Ile Gln Ser Leu Val Gly Ser Thr Val Gln Leu Arg Tyr			
450	455	460	
20 His Arg Arg Ser Leu Tyr Cys Pro Asp Asn Pro Ser Ile Arg Pro Thr			
465	470	475	480
Ser Glu Leu Lys Asn Cys Val Leu Gln Thr Asp Gly Phe Tyr Glu Cys			

	485	490	495
	Val Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg		
	500	505	510
	Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu		
5	515	520	525
	Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Asn Val Lys Ala Glu		
	530	535	540
	Ile Thr Ile Asn Thr Gly Leu Leu Lys Val Ser Trp Glu Lys Pro Val		
	545	550	555
	560		
10	Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Asn Gly		
	565	570	575
	Lys Glu Ile Gln Trp Lys Thr His Glu Val Phe Asp Ala Lys Ser Lys		
	580	585	590
	Ser Ala Ser Leu Pro Val Ser Asp Leu Cys Ala Val Tyr Val Val Gln		
15	595	600	605
	Val Arg Cys Arg Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser		
	610	615	620
	Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Val Met Asp Val Lys Val Pro Met Arg Gly		
	625	630	635
	640		
20	Pro Glu Phe Trp Arg Ile Met Asp Gly Asp Ile Thr Lys Lys Glu Arg		
	645	650	655
	Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys		

	660	665	670
	Ser Val Arg Arg Tyr Val Val Lys His Arg Thr Ala His Asn Gly Thr		
	675	680	685
	Trp Ser Gln Asp Val Gly Asn Gln Thr Asn Leu Thr Phe Leu Trp Ala		
5	690	695	700
	Glu Ser Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala		
	705	710	715
	Ser Leu Val Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val		
	725	730	735
10	Asn Ala Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val		
	740	745	750
	Ile Leu Ser Trp Thr Leu Ser Pro Asn Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu		
	755	760	765
	Val Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Asp Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu		
15	770	775	780
	Arg Ile Pro Ser Asn Val Asn Lys Tyr Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile		
	785	790	795
	Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly		
	805	810	815
20	Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Asp Ile Ala		
	820	825	830
	Lys Gln Gln Asn Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Ile Ile Ile		

835	840	845
Ser Ser Cys Val Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His Gln Arg		
850	855	860
Met Lys Lys Leu Phe Trp Asp Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn Cys Ser		
5 865	870	875
Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Ala Asp Thr Leu***		
885	890	

配列番号 : 4

10 配列の長さ : 2685

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA (cDNA)

15 配列の特徴 :

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1.. 2682

特徴を決定した方法 : S

配列 :

20 ATGACGTGTC AGAAATTCTA TGTGGTTTG TTACACTGGG AATTTCTGTA TGTGATAACT 60
 GCACTTAACC TGGCCTATCC AACCTCTCCC TGGAGATTAA AGCTGTTTG TGCGCCACCG 120
 AGTACAAC TGACTCCTT TCTCTCTCCT GCTGGAGTCC CAAACAATAC TTCGTCTTG 180

AAGGGGGCTT CTGAAGCACT TGTTGAAGCT AAATTTAATT CAACTGGTAT CTACGTTCT 240
GAGTTATCCA AAACCATTTC CCACTGTTGC TTTGGGAATG AGCAAGGTCA AAACTGCTCC 300
GCACTCACAG GCAACACTGA AGGGAAGACG CTGGCTTCAG TGGTGAAGCC TTTAGTTTC 360
CGCCAACTAG GTGTAAACTG GGACATAGAG TGCTGGATGA AAGGGGACTT GACATTATTC 420
5 ATCTGTCATA TGGAACCATT ACTTAAGAAC CCCTTCAAGA ATTATGACTC TAAGGTTCAC 480
CTTTATATG ATCTGCCTGA AGTTATAGAT GATTTGCCTC TGCCCCACT GAAAGACAGC 540
TTTCAGACTG TCCAGTGCAA CTGCAGTGT CGGGAATGCG AATGTATGT ACCAGTACCC 600
AGAGCCAAAG TCAACTACGC TCTTCTGATG TATTTAGAAA TCACATCTGC TGGTGTGAGT 660
TTTCAGTCAC CTCTAATGTC ACTGCAGCCC ATGCTTGTG TGAAGCCGA TCCACCGCTG 720
10 GGTTTGCCTA TGGAAGTCAC AGATGATGGT AATTTAAAGA TTTCATGGGA CAGCCAAACA 780
AAAGCACCATT TTCCACTTCA ATATCCGGTG AAATATTTAG AGAATTCTAC AATCGTAAGA 840
GAGGCTGCTG AAATCGTCTC GGATACATCT CTGCTGGTAG ACAGCGTGCT TCCTGGGTCT 900
TCATACGAGG TCCAGGTGAG GAGCAAGAGA CTGGATGGCT CAGGAGTCTG GAGTGAUTGG 960
AGTTTACCTC AACTCTTAC CACACAAGAT GTCATGTATT TTCCACCCAA AATTCTGACG 1020
15 AGTGTGGAT CCAATGCTTC CTTTGCTGC ATCTACAAAA ATGAGAACCA GACTATCTCC 1080
TCAAAACAAA TAGTTGGTG GATGAATCTA GCCGAGAAGA TCCCCGAGAC ACAGTACAAC 1140
ACTGTGAGTG ACCACATTAG CAAAGTCACT TTCTCCAACC TGAAAGCCAC CAGACCTCGA 1200
GGGAAGTTA CCTATGATGC AGTGTACTGC TGCAATGAGC AGGCATGCCA TCACCGCTAC 1260
GCTGAATTAT ATGTGATCGA TGTCAATATC AATATATCAT GTGAAACTGA CGGGTACTTA 1320
20 ACTAAAATGA CTTGCAGATG GTCACCCAGC ACAATCCAAT CACTAGTGGG AAGCACTGTG 1380
CAGTTGAGGT ATCACAGGCG CAGCCTGTAC TGTCCCGATA ATCCATCTAT TCGTCCTACA 1440
TCAGAGCTCA AAAACTGCGT CTTACAGACA GATGGCTTT ATGAATGTGT TTTCCAGCCA 1500

ATCTTCTAT TATCTGGCTA TACAATGTGG ATCAGGATCA ACCATTCTT AGGTTCACTT 1560
GACTCTCCAC CAACGTGTGT CCTTCCTGAC TCCGTAGTAA AACCACTACC TCCATCTAAT 1620
GTAAAAGCAG AGATTACTAT AAACACTGGA TTATTGAAAG TATCTTGGGA AAAGCCAGTC 1680
TTTCCAGAGA ATAACCTTCA GTTCCAGATT CGATATGGCT TAAATGGAAA AGAAATACAA 1740
5 TGGAAAGACAC ACGAGGTATT CGATGCAAAA TCAAAATCGG CCAGCCTGCC AGTGTCAAGAT 1800
CTCTGTGCGG TCTATGTGGT ACAGGTTCGC TGCCGGCGGT TGGATGGACT AGGGTATTGG 1860
AGTAATTGGA GCAGTCCAGC CTACACTCTT GTCATGGATG TAAAAGTTCC TATGAGAGGG 1920
CCTGAATTCT GGAGAATAAT GGATGGGGAT ATTACTAAAA AGGAGAGAAA TGTCACCTTG 1980
CTTTGGAAGC CACTGATGAA AAATGACTCA CTGTGTAGTG TGAGGAGGTA TGTGGTGAAG 2040
10 CATCGTACTG CCCACAATGG GACATGGTCA CAAGATGTGG GAAATCAGAC CAATCTCACT 2100
TTCCTGTGGG CAGAATCAGC ACACACTGTT ACAGTTCTGG CCATCAATT CATCGGTGCC 2160
TCCCTTGTGA ATTTAACCT TACGTTCTCA TGGCCCATGA GTAAAGTGAA TGCTGTGCAG 2220
TCACTCAGTG CTTATCCCCT GAGCAGCAGC TGCATCC TTTCTGGAC ACTGTCACCT 2280
AATGATTATA GTCTGTTATA TCTGGTTATT GAATGGAAGA ACCTTAATGA TGATGATGGA 2340
15 ATGAAGTGGC TTAGAATCCC TTCGAATGTT AACAAAGTATT ATATCCATGA TAATTTATT 2400
CCTATCGAGA AATGTCAGTT TAGTCTTAC CCAGTATTG TGGAAGGAGT TGGAAAACCA 2460
AAGATAATTA ATGGTTTCAC CAAAGATGAT ATGCCAAC AGCAAAATGA TGCAGGGCTG 2520
TATGTCATTG TACCGATAAT TATTCCTCT TGTGTCTGC TGCTCGGAAC ACTGTTAATT 2580
TCACACCAGA GAATGAAAAA GTTGTGTTGG GACGATGTTG CAAACCCCAA GAATTGTTCC 2640
20 TGGGCACAAG GACTTAATT CCAGGAGAGA CGGGACACTC TTTGA 2685

請求の範囲

1. 配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするοb蛋白レセプター遺伝子。
5
2. 配列番号2で示される塩基配列を有することを特徴とする請求項1記載のοb蛋白レセプター遺伝子。
3. 肥満の表現形質を発現する温血動物由來のοb蛋白
10 レセプター遺伝子。
4. 請求項1又は2記載のοb蛋白レセプター遺伝子において、コドン269位がグルタミンの代わりにプロ
リジンをコードする塩基配列であることを特徴とする請
15 求項3記載のοb蛋白レセプター遺伝子。
5. 請求項1又は2記載のοb蛋白レセプター遺伝子において、塩基番号806位のヌクレオチドがアデニン
の代わりにシトシンであることを特徴とする請求項3
20 または4記載のοb蛋白レセプター遺伝子。
6. 請求項1乃至2に記載されるοb蛋白レセプター遺

伝子に対する変異を検出することを特徴とする、肥満の表現形質を発現する温血動物の遺伝子診断方法。

7. 前記変異が制限酵素部位の新たな形成及び／又は欠失を導くものである、請求項6記載の肥満表現形質を発現する温血動物の遺伝子診断方法。
5
8. 前記制限酵素部位が、Hpa II又はMsp Iの少なくとも1種であることを特徴とする請求項6又は7記載の肥満表現形質を発現する温血動物の遺伝子診断方法。
10
9. 請求項3乃至5のいずれかに記載されるοb蛋白レセプター遺伝子を検出することを特徴とする請求項6乃至8のいずれかに記載の肥満表現形質を発現する温血動物の遺伝子診断方法。
15
10. 請求項6乃至9のいずれかに記載される肥満表現形質を発現する温血動物の遺伝子診断方法における、請求項1乃至5に記載されるいずれか少なくとも1種のοb蛋白レセプター遺伝子の一部又は全部の使用。
20

11. 請求項 1 乃至 5 に記載されるいずれか少なくとも 1 種の o. b 蛋白レセプター遺伝子の一部又は全部を含むことを特徴とする、肥満表現形質を発現する温血動物を遺伝子学的に検出するための診断剤。

5

12. 請求項 3 乃至 5 のいずれかに記載される o. b 蛋白レセプター遺伝子を有することを特徴とする、肥満表現型の温血動物。

10 13. 請求項 3 乃至 5 のいずれかに記載される o. b 蛋白レセプター遺伝子を有することを特徴とする、請求項 12 記載の肥満表現型疾患モデル動物。

15

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01470

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/00, A01K67/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00, A01K67/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, GENETYX-CDROM

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Cell Vol. 84, February 9, 1996 (09. 02. 96) Hong Chen et al. "Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db mice" P. 491-495	1 - 13
Y	Cell Vol. 83 (1995) Louis A. Tartaglia et al. "Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R" P. 1263-1271	1 - 13
Y	JP, 62-175173, A (Sankyo Co., Ltd.), July 31, 1987 (31. 07. 87) (Family: none)	1 - 13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 29, 1997 (29. 07. 97)

Date of mailing of the international search report

August 12, 1997 (12. 08. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl⁶ C12N15/00, A01K67/00, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl⁶ C12N15/00, A01K67/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, GENETYX-CDROM

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Cell VOL. 84, 9. 2月. 1996 (9. 02. 96) Hong Chen . et al 「Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor:Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db mice」 P. 491-495	1-13
Y	Cell VOL. 83 (1995) Louis A. Tartaglia. et al 「Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R」 P. 1263-1271	1-13
Y	JP、62-175173、A、(三共株式会社) 31. 7月. 1987 (31. 07. 87) (ファミリーなし)	1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
29. 07. 97

国際調査報告の発送日

12. 08. 97

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)
藤田 節

4B 8515

電話番号 03-3581-1101 内線 3449